动 物 学 研 究 2008，Aug. 29(4)：415-420 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research doi:10.3724/SP.J.1141.2008.04415

人外周血单核细胞来源的树突状细胞的体外“2＋2”快速法培养及其鉴定

陆小鹏[1,3]，李 剑[2]，孙正华[1,3]，赵 娜[1,3]，刘 洁[1]，张华堂[1,*]

(1. 中国科学院昆明动物研究所 免疫生物学实验室，云南 昆明 650223；2. 中国科学院昆明动物研究所 中心实验室，云南 昆明 650223；3. 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：以人浓缩白细胞来源的 $CD14^+$单核细胞为前体，建立体外快速培养树突状细胞（dendritic cell, DC）的方法。采用密度梯度离心和 MACS 磁珠分选系统，收集高纯度的 $CD14^+$单核细胞；以 rGM-CSF、rIL-4 联合分化 2 天诱导不成熟 DC，再将分化后的细胞以 rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2 共同活化 2 天得到成熟 DC。流式细胞仪检测结果表明，分化 2 天的不成熟 DC 具有吞噬能力，且表型 HLA-DR、CD40、CD80 表达在 80％以上，CD83、CD86 基本不表达，成熟后的 DC 能够激活 T 细胞增殖，HLA-DR 表达增高，CD83、CD86 表达占 85％。

关键词：单核细胞； 树突状细胞；“2＋2”快速法
中图分类号：Q25 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2008)04-0415-06

A “2＋2 days” Fast Protocol for the Generation of Dendritic Cells from Human Blood Monocytes

LU Xiao-peng[1, 3], LI Jian[2], SUN Zheng-hua[1, 3], ZHAO Na[1, 3], LIU Jie[1], ZHANG Hua-tang[1,*]

(1. *Immunobiology Lab, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming* 650223, *China;* 2. *Core Faculty, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Science, Kunming* 650223, *China;* 3. *Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: A “2＋2 days” fast protocol for the generation of dendritic cells（DC） from high purity human monocytes *in vitro* has been established. During the 2-step differentiation and activation process, we demonstrated that 2 days of culture with GM-CSF and IL-4 were sufficient to generate immature DCs capable of antigen uptake. Similarly the mature DCs were activated with a cocktail of rTNF-α, IL-1β, IL-6, and PGE_2 from immature DC in 2 days. This “2＋2” fast DC had the same phenotype and function as the “6＋2” standard DC.

Key words: Monocyte; Dendritic cell; “2＋2 days” fast method

树突状细胞（dendritic cell，DC）是体内高效的抗原递呈细胞（antigen presenting cel1，APC）。它们以未成熟状态分布于机体的皮下或黏膜组织内，通过识别捕获微环境内的“异己”成分，将其加工并携带至淋巴组织，完成抗原呈递和 DC 成熟的过程，进而激活静息 T 淋巴细胞（resting T cell）应答，启动免疫反应（Sousa，2006）。

目前，在基础研究和临床应用领域，DC的获得主要有3种方式：①直接从外周血分离；②从脐带血和骨髓来源的$CD34^+$细胞诱导；③由外周血来源的$CD14^+$单核细胞（monocyte）诱导（Tuyaerts et al，2007）。由于外周血DC含量不到1％，脐带血和骨髓中$CD34^+$细胞仅有1％左右（Jeras Bergant & Repnik，2005），而外周血中$CD14^+$单核细胞达15％左右（Campbell-AnsonKentor & Radvanyi 2008），所以通常选择$CD14^+$单核细胞为前体，按“6＋2”传统法，经过分化和活化两个阶段诱导DC（standard DC）。即将贴壁收集的$CD14^+$单核细胞，用分化因子诱导5－7天得到具有抗原摄取能力的不成熟DC（immature DC, iDC），再用活化因子刺激2－3天得

收稿日期：2008-04-03；接受日期：2008-06-17
基金项目：国家自然科学基金面上项目（30771951）；中国科学院“百人计划”项目；中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX1-YW-R-16）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: zhanght@post.kiz.ac
第一作者简介：硕士研究生，E-mail：luxiaopengcas@yahoo.cn

到能够激活T细胞增殖的成熟DC（mature DC, mDC）(Romani et al,1996; Zhou & Tedder, 1996)。

由于$CD14^+$单核细胞向DC分化的过程中并不发生增殖，随着体外培养时间的延长细胞大量死亡，传统法诱导DC的得率相对较低。另一方面，DC为终末分化细胞，无法在体外形成稳定的细胞系。传统法极大的制约了DC的实验研究，其在DC诱导周期与得率两方面的不足亟待改进。

而在体内，DC前体细胞分化成DC只需要1－4天， Randolph et al（1998）、Santini et al (2000）和Landi et al (2007）等以此为基础，在体外培养体系中加入内皮细胞、I类干扰素，缩短了体外诱导DC的时间周期。Dauer在前人研究的基础上，提出了48h "Fast DC"快速诱导DC模型（Dauer et al, 2003)。但其成熟阶段的特征表型CD83表达不高，小于60％（Obermaier et al, 2003)。其可行性还存有较大争议，所以在DC的体外培养过程中，诱导所需的确切时间以及培养条件仍需进一步探讨。

为此，本研究利用MACS磁珠分选系统，从人浓缩白细胞中分选出高纯度的$CD14^+$单核细胞，分阶段用rGM-CSF、rIL-4分化，rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2联合活化，定向诱导出在表型和功能上与传统法相一致的 DC。建立了一种快捷、可靠的体外"2＋2"培养DC（fast DC）的优化方法。

1 材料方法

1.1 试 剂

RPMI1640培养基，胎牛血清为GIBICO公司产品；淋巴细胞分离液为上海恒信有限公司产品；CD14 MicroBeads human monocyte kit 德国Miltenyibiotec产品；rGM-CSF、rIL-4、rTNF-α 购自R&D公司；IL-1β、IL-6为Peprotech公司产品；PGE_2为Alexis公司产品。PE标记的CD80、CD86、CD83、HLA-DR、CD14、CD40、CD1a及同型对照 IgG1、IgG2b、IgG2a 购于 BioLegend 公司；Monoclonal Anti-human DC-SIGN-Phycoerythrin购于R&D公司；FITC-dextran和CFSE染料购自Sigma公司。

1.2 仪器设备

LSM510 META激光共聚焦扫描显微镜（德国Zeiss公司），FACS Vantage SE流式细胞分析仪（BD公司），HEPA Class100细胞培养箱和Forma ClassII A2生物安全柜（Thermo公司），Nikon TS 100倒置相差显微镜（Nikon公司）。

1.3 $CD14^+$单核细胞收集

采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法，从浓缩白细胞（取自昆明市血液中心）收集外周血单个核细胞（PBMC）；按 CD14 MicroBeads human monocyte kit操作说明，分离收集$CD14^+$单核细胞，并将$CD14^-$细胞冻存用于T细胞增殖实验。

1.4 DC诱导

将$CD14^+$单核细胞按$1×10^6$cells/mL接种于6孔板中，用3mL含10％胎牛血清、2mmol/L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的RPMI1640完全培养基培养，并加诱导因子rGM-CSF（1 000 U/mL)、rIL-4（500 U/mL)，5％CO_2，37℃条件下培养。每隔2天换半液，保持细胞因子终浓度一致，分别诱导2天或6天后加入成熟诱导因子rTNF-α（10 ng/mL)、IL-1β（10ng/mL)、IL-6（10ng/mL)、PGE_2（1μg/mL）培养2天。

1.5 流式检测细胞表型

采用1 000 r/min离心10 min，分别收集上述培养时间的细胞，再用含0.1%BSA的PBS冲洗封闭细胞一次，离心去上清后将细胞按 $5×10^5$/50 μL 重悬于1.5mL的EP管中，加入2μL荧光标记的抗体，常温下染色20min，离心并取300μ LPBS把染色后的细胞转移于流式管，用于流式细胞仪检测，软件WinMDI 2.9分析数据。

1.6 FITC-dextran摄取检测

收集单核细胞，不成熟DC和成熟DC分别按$1×10^6$cells/mL悬于RPMI1640完全培养基中，再加入FITC-dextran（0.5mg/mL)，37℃培养箱或0℃孵育30min，1000r/min离心10min收集细胞，用PBS清洗3次，最后重悬于流式管，分析检测细胞的荧光强度，以0℃条件为基准，判断细胞的抗原摄取能力。

1.7 混合淋巴细胞增殖反应

将冻存的$CD14^-$细胞复苏用于做同种异体T细胞增殖实验。1 000 r/min 离心 10 min，收集复苏1天的$CD14^-$细胞，PBS洗两遍，37℃标记CFSE（羟基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺脂）染料 10 min，$2×10^5$ cells/200 μL 植于96孔板，再按1∶1、1∶10、1∶100、1∶1000（DC/$CD14^-$）加入成熟DC，共同培养3天后，收集细胞，做流式检测，以CFSE荧光强度的衰减次数显示细胞增殖变化。

2 结　果

2.1 MACS 磁珠分选得到高纯度的 CD14⁺单核细胞

将经淋巴分离液离心收集的 PBMC 与 MACS 磁珠分选后的细胞分别标记 CD14 荧光抗体，流式检测表明在 PBMC 中 $CD14^+$单核细胞约占 11%(图 1a)，而磁珠分选后 $CD14^+$单核细胞纯度达 95%以上（图 1c)。

2.2 “2＋2”快速法与“6＋2”传统法诱导 DC 的形态观察比较

CD14 磁珠分选收集的单核细胞中加入 rGM-CSF、rIL-4 联合分化 2 天或 6 天（iDC)，再用成熟刺激因子活化 2 天（mDC)。在传统法成熟过程中，选择加入 LPS 或 rTNF-α 或 rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2 联合活化，其中 LPS 或 rTNF-α 单独作用时成熟 DC 的特征表面分子 CD83 表达不高（数据未给出），而 rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2 联合作用后 CD83 表达在 85%以上（图 3e)，所以在快速法诱导的成熟过程中选择此 4 种因子共同活化。从形态变化来看，$CD14^+$单核细胞呈圆形（图 2a)，经 rGM-CSF 和 rIL-4 的诱导 2 天后，细胞聚集成大小不均的集落，并在细胞表面有少许的突起（图 2b)，到 6 天后，细胞贴壁，外形不规则，表面有少许明显的细刺状突起（图 2c)，经 rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2 成熟刺激 2 天后，细胞表现出典型的成熟 DC 形态，悬浮细胞增多，体积变大，表面长出大量细刺状的触须（图 2d、e、f)。“2＋2”快速法诱导的不成熟 DC 形态不及“6＋2”传统法明显，而成熟 DC 形态基本一致。

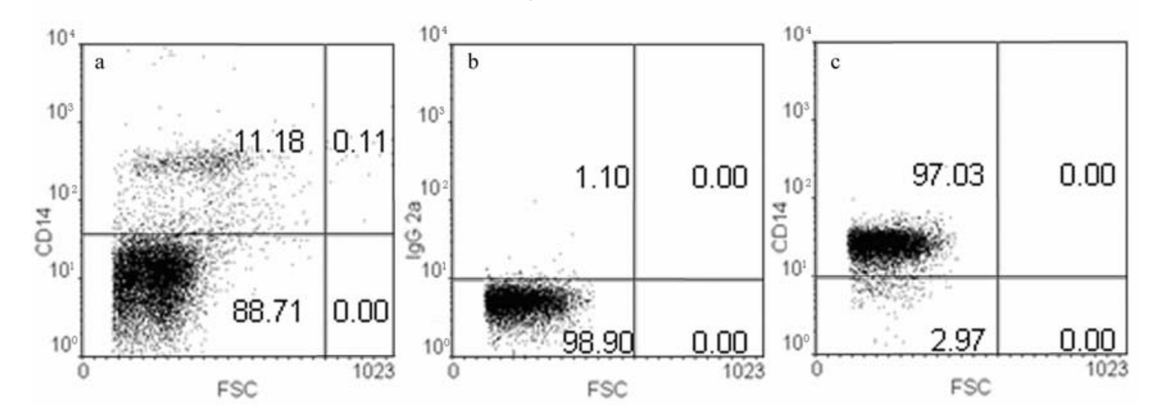


图 1　$CD14^+$单核细胞在磁珠分选前后的含量

Fig. 1　The purity of monocytes before and after MACS selection

a：PBMC；b：分选后细胞同型对照 Isotype control；c：分选后细胞纯量 Purity post selection.

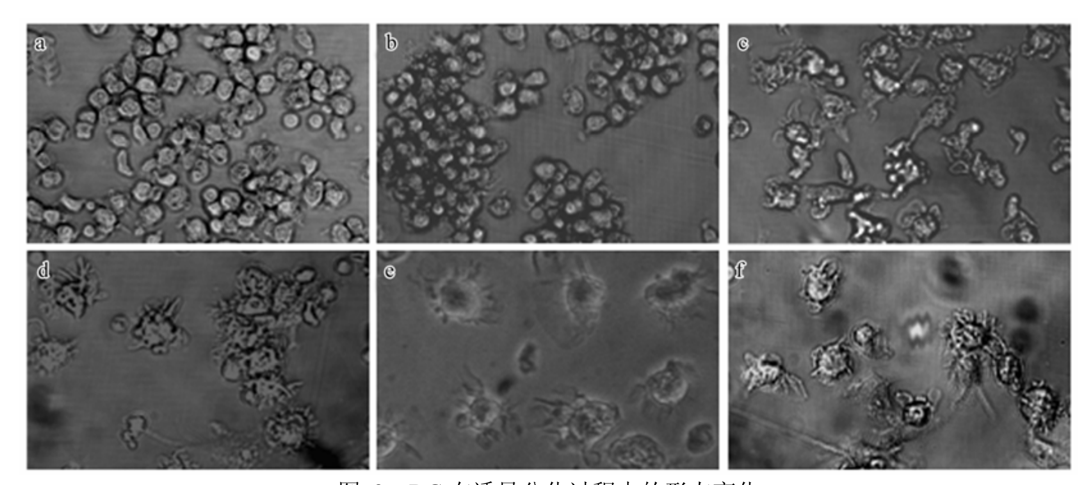


图 2　DC 在诱导分化过程中的形态变化

Fig. 2　The morphology of monocytes and DC

a：单核细胞；b：诱导 2 天不成熟 DC；c：诱导 6 天不成熟 DC；d、e：2+2 成熟 DC，f：6+2 成熟 DC。

（a－d、f：共聚焦扫描图片×200；e：倒置显微镜照片×200)。

a: monocyte, b: 2d iDC, c: 6d iDC and d, e: fast mDC, f: standard mDC. （a-d, f: laser confocal scaning, ×200; e：invert microscope, ×200)。

2.3 单核细胞、不成熟 DC、成熟 DC 的表型分析

利用流式细胞仪检测单核细胞和DC细胞表面分子的结果表明，刚分离的$CD14^+$单核细胞表达HLA-DR、CD80，低表达DC-SIGN，不表达CD86、CD83、CD40、CD1a（图3a）。经2天或6天刺激后的iDC，CD14明显下调，HLA-DR、CD40、CD1a、CD80、CD86、DC-SIGN上调，CD83基本无变化（图3b、d）。经2天成熟诱导后的mDC，基本不表达CD14，高表达HLA-DR、CD40、CD80、CD86、CD83、中度表达CD1a和DC-SIGN（图3c、e）。快速法与经典法在表面标志上的差别在于，在iDC分化阶段，“2＋2”法下调CD14，上调HLA-DR、DC-SIGN的程度不及传统法明显（图3b、d）；而mDC活化阶段，DC-SIGN和CD1a的下调，快速法更加明显（图3c、e）；但在诱导DC的全部过程中，两种方法影响表型变化的趋势一致，CD14表达明显减低，HLA-DR、CD86和CD83在成熟阶段表达显著增强，CD1a、DC-SIGN集中表达在不成熟阶段，而后则下调；CD40在不成熟阶段的表达量与成熟阶段基本维持不变。

2.4 不成熟DC的吞噬功能

抗原吞噬能力是iDC的主要功能之一，为此用流式的方法比较单核细胞、iDC和mDC在37℃条件下对Dextran的摄取能力的差异，结果证实，iDC具有吞噬功能（图4b、d），而mDC吞噬能力丧失（图3c、e）；单核细胞有微弱的吞噬能力（图3a）。两种方法诱导的iDC吞噬能力基本相同，在成熟过程中吞噬能力的变化也基本一致（图4b、c）。

2.5 成熟DC刺激T细胞增殖反应

iDC在摄入抗原后，逐渐成熟并迁移到T淋巴细

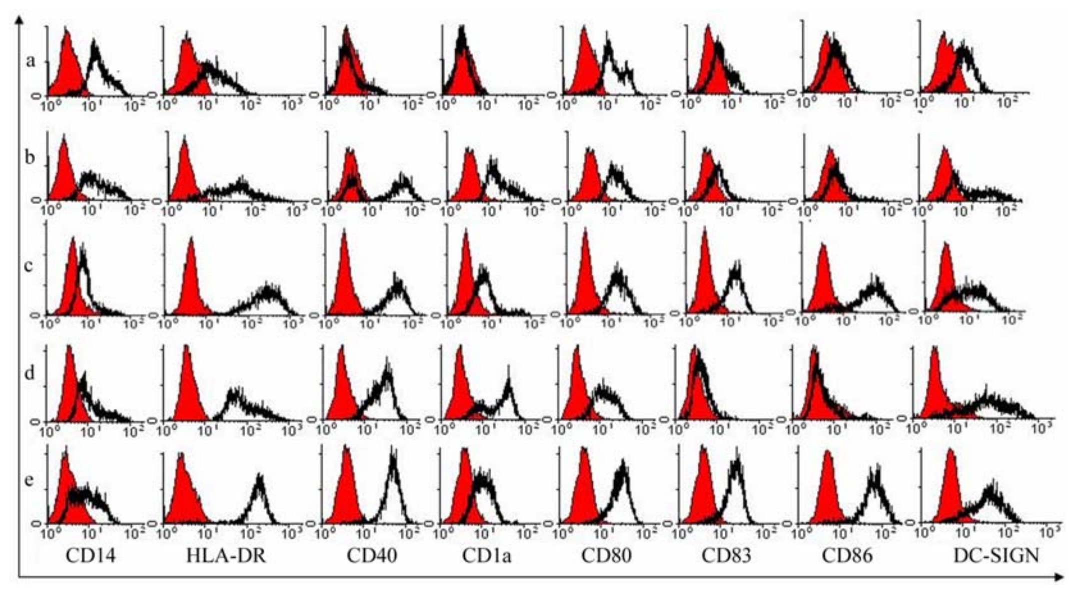


图 3 传统法与快速法诱导 DC 的表面标志流式检测变化

Fig. 3 The characteristic phenotype of fast DC versus stand DC

a：单核细胞；b：2 天不成熟 DC；c：2+2 成熟 DC；d：6 天不成熟 DC，e：6+2 成熟 DC。

a: monocyte; b: fast iDC; c: fast mDC; d: standard iDC; e: standard mDC.

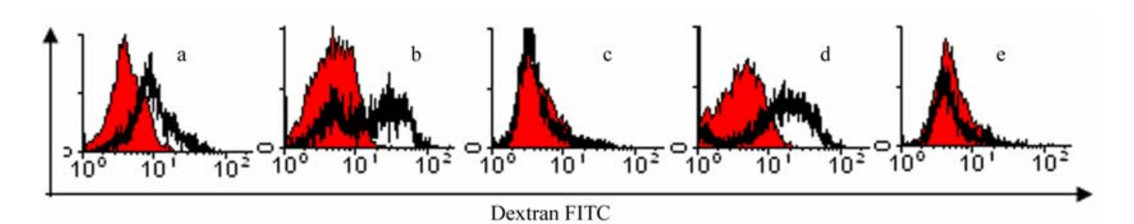


图 4 DC 对 Dextran 摄取能力变化

Fig. 4 Dextran uptake capacity of DC

a：单核细胞、b：2 天不成熟 DC， c：2+2 成熟 DC，d：6 天不成熟 DC, e：6+2 成熟 DC。

a: monocyte,,b: fast iDC, c: fast mDC, d: standard iDC, e: standard mDC.

胞区域，递呈抗原刺激T细胞增殖引发免疫反应。本实验也同时用混合淋巴细胞培养（Mix Lymphocyte Reaction, MLR）分析比较了两种方法诱导的mDC激活T细胞增殖能力的差异。发现两种方法诱导的mDC在激活T细胞的能力上基本相同，DC与PBMC共同培养3天后，PBMC增殖趋势相似，且在DC与PBMC细胞数量相近时（1∶1），细胞明显增殖两次。(图5a、b)。

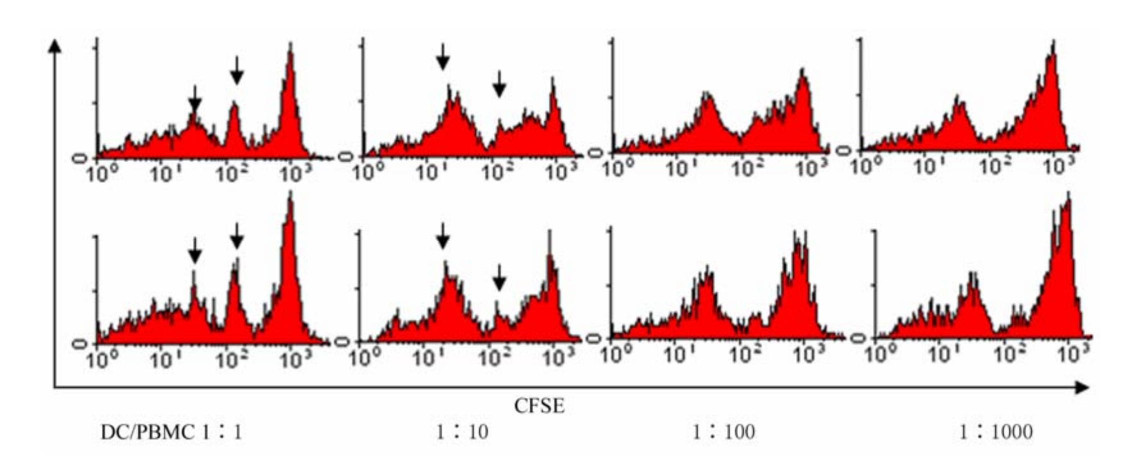


图 5　混合淋巴细胞培养检测成熟DC激活T细胞增殖的能力

Fig. 5　The stimulatory capacity of mature DC in the primary allogeneic MLR.

a：2+2成熟DC，b：6+2成熟DC。a: fast mDC, b: standard mDC

3　讨　论

体外诱导DC的关键在于：高纯度的前体细胞，培养过程中保持细胞高存活力，稳定的培养体系和恰当的诱导因子，以及合适的培养时间。本实验在收集$CD14^+$细胞时，放弃了传统贴壁的办法，而采用MACS分选系统，通过在磁场中阳性筛选，快速而且高纯度的收集单核细胞。避免了PBMC贴壁培养过程和悬浮细胞淘洗过程，减少了对细胞的物理损伤，保证了$CD14^+$单核细胞的纯度与活力。体外培养过程中，同时也发现单核细胞培养72 h后，细胞开始大量死亡。为提高得率，本实验通过细胞因子搭配和培养时间调整，使单核细胞在48 h实现分化，96 h完成成熟，提高了单核细胞向DC诱导的效率。

在诱导DC的细胞因子选择方面，本实验以Sallusto & Lanzavecchia(1994) 和 Zhou & Tedder(1996)建立的分阶段两步诱导DC的方法为基础，用GM-CSF、IL-4、rTNF-α 将$CD14^+$单核细胞向DC诱导，但在培养过程中出现了大量巨噬细胞，且成熟阶段的特征表型CD83表达较低、仅占30％左右。通过调整细胞因子IL-4和GM-CSF在培养体系的浓度用量，证实GM-CSF是诱导DC的主要因子，而IL-4的作用是阻止单核细胞分化为巨噬细胞（Caux et al，1992），只需要保持比GM-CSF更低的浓度。成熟活化阶段，则尝试将rTNF-α改为LPS（KoskiLyakh & Rice，2001）或者rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2多种因子联合活化iDC成熟(Feuerstein et al，2000)。结果发现GM-CSF（1000 U/mL）、IL-4（500 U/mL）和rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2联合激活能更快速高效的诱导DC。

在诱导的时间上，通过在不同时间点收集细胞，分析比较其形态、表型和功能，寻找诱导 DC 所需的恰当时间。结果发现在不成熟因子rGM-CSF、rIL-4 作用下，分化 24h 后细胞仍高表达 CD14，低表达 CD1a，能够吞噬 dextran，与文献报道基本相符，表面标志的表达水平不及典型 iDC 高（Jarnjak-Jankovic et al，2007）。但 48 小时后细胞已具有较高吞噬 dextran 的能力，且 CD14 表达减少，，HLA-DR、CD40、CD1a、CD80、DC-SIGN 的表达水平升高，与诱导 6 天的 iDC 表型基本一致，仅 DC-SIGN 的表达相对略低。综合细胞表型和抗原摄取功能，本实验将诱导 iDC 的时间改变为 2 天。成熟阶段，仍以传统法为标准，用 rTNF-α、IL-1β、IL-6、PGE_2 联合激活 2 天确保 iDC 的充分活化和成熟。形态、表型、功能结果表明活化后的细胞具备典型 mDC 的特征，细胞突起增多，高表达 HLA-DR、CD40、CD86、CD83，能激活 T 细胞增殖。

综上所述，“2＋2”法通过缩短分化阶段的时间

和选择成熟阶段的细胞因子组合诱导的 DC，在未成熟和成熟阶段，其形态、表型和功能都具备了传统法刺激形成的 DC 的特征。这种方法缩短了实验周期，节省实验成本，为肿瘤 DC 疫苗研制和 DC 功能研究提供了一种更便捷的途径。

参考文献:

Campbell-Anson RE, Kentor D, Wang YJ, Bushnell KM, Li Y, Vence LM, Radvanyi LG. 2008. A new approach for the large-scale generation of mature dendritic cells from adherent PBMC using roller bottle technology [J]. *J Immune Based Therapies and Vaccines*, **6**(1): 1-10.

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. 1992. GM-CSF and TNF-Alpha cooperate in the generation of dendritic langerhans cells [J]. *Nature,* **360**(6401): 258-261.

Daue M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: A novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors [J]. *J Immunol*, **170**(8): 4069-4076.

Feuerstein B, Berger TG, Maczeka C, Ro¨dera C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kussc O, Diepgenc T, Schulera G, Thurnera BS. 2000. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use [J]. *J Immunol Methods,* **245**(1-2): 15-29.

Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Sæbøe-Larssen S, Kvalheim G, Gaudernack G. 2007. A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines [J]. *Bmc Cancer,* **7**(119):2-9.

Jeras M, Bergant M, Repnik U. 2005. *In vitro* preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses [J]. *Transpl Immunol*, **14**(3-4): 231-244.

Joeri ST, Corthals AJ, t Neyns B, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K, Bonehill A. 2007. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Immunol Immu,* **56**(10): 1513-1537.

Koski GK, Lyakh LA, Rice NR. 2001. Rapid lipopolysaccharide-induced differentiation of $CD14^+$ monocytes into $CD83^+$ dendritic cells is modulated under serum-free conditions by exogenously added IFN-r and endogenously produced IL-10 [J]. *Eur J Immunol*, **31**(14): 3773-3781.

Landi A, Babiuk LA, Hurk S. 2007. High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer [J]. *J Leukocyte Bio*, **82**(4): 849-860.

Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A. 2003. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes[J]. *Biol Proced Online,* **5**(1): 197-203.

Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking [J]. *Science,* **282**(5388): 480-483.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood：An improved method with special regard to clinical applicability [J]. *J Immunol Methods*, **196**(2): 137-151.

Sallusto F，Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble-antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by Tumor-Necrosis-Factor-Alpha [J]. *J Exp Med,* **179**(4): 1109-1118.

Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Pucchio TD, Belardelli F. 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in Hu-PBL-SCID mice [J]. *J Exp Med*, **191**(10): 1777-1788.

Sousa CR. 2006. Dendritic cells in a mature age [J]. *Nat Rev Immunol*, **6**(6): 476-483.

Zhou LJ, Tedder TF. 1996. $CD14^{(+)}$ blood monocytes can differentiate into functionally mature $CD83^{(+)}$ dendritic cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **93**(6): 2588-2592.